



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 37 809 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
A 61 K 37/48
A 61 K 37/02

⑳ Aktenzeichen: P 40 37 809.8
㉔ Anmeldetag: 28. 11. 90
㉕ Offenlegungstag: 4. 6. 92

DE 40 37 809 A 1

㉑ Anmelder:
Yousif, Yehia Mohammed, 7800 Freiburg, DE

㉒ Erfinder:
gleich Anmelder

㉑ Anwendungen von staphylokokkal neutrale Phosphatase und 70 KD Protein

㉑ *Grampositive* Staphylokokkal Bakterien sind bekannt als Mitogenen Faktoren für B-Lymphozyten. Protein A war der wichtigste Stimulierungsfaktor. Hochgereinigtes Protein A und rekombinantes Protein A hat keinen stimulierenden Effekt auf B Zellen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die gereinigten Lymphozytenstimulierungsfaktoren, Immunoglobulinen Bindungsfaktoren, anzuwenden. Die Lösung der Aufgabe wird durch ein Reinigungs-Verfahren erreicht, dessen Zielsetzung die Trennung von Phosphatase und 70 kD Protein aus der gesamten Protein Lösung ist.

1. Stimulierung von Terminalen Blutlymphozyten und Immunoglobulinsynthese.
2. Abtrennung von Immunoglobulinen aus Lösungen durch Anwendung von immobilisierten Phosphatase und 70 kD Protein zur aktivierten soliden Phase Matrix.

DE 40 37 809 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Anwendungen von staphylokokkal neutrale Phosphatase und 70KD Protein nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 bis 2.

Pokeweed Mitogen, IL-2 und gram positive staphylokokkal Bakterien sind bekannt als Mitogenen Faktoren für B-Lymphozyten: Protein A war durch B-Zellen oberflächliche Immunoglobulinbindungs-Mechanismus der mögliche Stimulierungsfaktor. Es ist der Fachwelt bekannt, daß von keiner anderen Seite, Immunoglobulinbindungs-Proteine als Protein A von Staphylokokken vorhanden sind. Protein A bindet hauptsächlich nur Fc Teil von IgG und nicht IgM, IgA oder F(ab)'2 Teil.

Hochgereinigtes Protein A und rekombinante Protein A hat keinen stimulierenden Effekt auf B-Zellen, gleichzeitig werden intakte Staphylokokkal-Zellen stimuliert Igs synthetisieren. Nicht alle Immunoglobulinbindungs-Aktivitäten von Staphylokokken kann man durch Protein A allein erklären.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die gereinigten B-Zellenstimulierungsfaktoren, Immunoglobulinen und F(ab)'2 Teile Bindungsfaktoren, anzuwenden. Die Lösung der Aufgabe wird durch ein Reinigungs-Verfahren erreicht, dessen Zielsetzung die Trennung von Phosphatase und 70KD Protein aus der gesamten Protein-Lösung ist.

Bakterielleswachstum-Medien und -Kulturen: Tryptic Soy Broth (TSB), Brain Heart infusion Medium und chemically defined medium (CDM) bei 37°C für 18–24 Stunden mit rütteln.

Es gibt 3 Wege um die Proteine zu erhalten. Diese Wege sind wie folgt unter A–C beschrieben:

A) Ionenaustauschkromatography-Verfahren

Die Kultur wird bei 3,000 rpm für 30 min zentrifugiert. Die Bodensatz-Zellen werden mit 1M KCl, Tris-Puffer pH 8,5 für eine Stunde inkubiert. Der Überstand wird bei 45,000 rpm für 15 Stunden ultrazentrifugiert und gegen 0,2M NaCl, PBS-Puffer dialysiert. Die Lösung (40 ml) wird auf dem Kationenaustauscher-Matrix (z. B. Mono S, Dowex resin) aufgetragen. Lineargradient bis 1M NaCl, PBS-Puffer wird durchgeführt. Phosphatase wird bei 25–30% Endpuffer eluiert und 70KD Protein bei 30–35% Endpuffer eluiert.

Die Ausbeute:

- 3–4 mg reine Phosphatase/40 ml Gesamt-Protein-Waschlösungs-Extrakt nach dem Ultrazentrifugieren (GPEU).
- 3,5–5 mg reine 70KD Protein/40 ml (GPEU).

B) Immunoaffinitäts-Verfahren zur Reinigung von Phosphatase oder 70KD Proteine

Monoklonale Antikörper (Anti-Phosphatase oder Anti-70KD-Protein) wird mit dem aktivierten solide Phase Matrix (z. B. CN Br-aktivierte Sepharose 4B, 10 mg Protein/ml Matrix) in 0,5M Na inkubiert. Nach dem Waschen werden 10 Volumen von 10 mM Äthanolamine pH 7,4 mit dem Matrix für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. (GPEU) wird gegen PBS, 0,1M NaCl dialysiert und mit dem Matrix nach dem Waschen für 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Matrix wird in eine Säule abgefüllt und gewaschen und mit einem Eluierungs-Puffer (z. B. 100 mM Glycin pH 5) eluiert. Die entsprechenden

Fractionen werden gesammelt und neutralisiert.

Die Ausbeute:

- 5–9 mg reine Phosphatase/40 ml (GPEU).
- 6–10 mg reine 70 KD Protein/40 ml (GPEU).

5

C) Affinitätskromatography-Verfahren (IgG-Solide Phase Matrix) für Abtrennung von Phosphatase und 70KD Protein

10 5 ml IgG-Matrix (z. B. IgG-Protein A-Sepharose 6 oder IgG-Sepharose 6) wird mit Probenpuffer (0,2M NaCl, PBS) gewaschen. 7 ml (GPEU) nach Dialysierung gegen Probenpuffer wird mit dem Matrix für 3–12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wird das Matrix in eine Säule abgefüllt. 100 mM Glycin pH 5 wird dabei als Eluierungspuffer benutzt. Entsprechende Fractionen werden gesammelt und neutralisiert.

15 Die Ausbeute:

- 20 – 2,5–5 mg Phosphatase-70KD Protein/40 ml (GPEU).

Die biologische Eigenschaften von staphylokokkal Phosphatase:

25 Molekular-Gewicht:

- SDS-PAGE (12% Gel) zeigt 2 Banden (31,32 KD).

Isoelektrische Punkte (pI):

- Flach Gel Methode (Ampholiten 3–10 oder 9–11) zeigt keine Banden im Gel → pI > 10.

Substrats-Aktivität:

- Maximal enzymatische Aktivität liegt bei pH 7,4 mit P-N-Nitrophenol phosphat Substrat.

35

Die biologische Eigenschaften von staphylokokkal 70 KD Protein:

Molekular-Gewicht:

- 40 – SDS-PAGE (12% Gel) zeigt 1 Band (70 KD).

Isoelektrische Punkte (pI):

- Flach Gel Methode (Ampholiten 3–10 oder 9–11) zeigt keine Banden im Gel → pI > 10.

45

I) Anwendung von reiner Phosphatase und 70KD Protein als Stimulierungs-Faktoren für B-Lymphozyten zur Immunoglobulinsynthese

50 Reine Phosphatase und/oder 70KD Protein aktivieren die terminalen B-Lymphozyten, diese produzieren Immunoglobulin in der Kultur mit und ohne IL-2.

55 Terminalen Blutlymphozyten (PBL) wurden von 15 ml defibriniertes Venenblut mit Ficoll-Hypaque-Trennlösung durch Gradientenzentrifugation abgetrennt. Die vorhandenen (PBL) wurden nach dem Waschen in einer Konzentration von 10 Mio Zellen/ml in RPMI 1640 Medium + 10% fötalem Kälberserum in Falcon-Röhrchen über 6 oder 9 Tage bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre von 5% CO₂ + 95% Luft kultiviert.

Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

1. 6 und 9 Tage mit 2 µg/ml oder 20 µg/ml Phosphatase.
2. 6 und 9 Tage mit 2 µg/ml oder 20 µg/ml 70KD Protein.
3. Pokeweed Mitogen, IL-2 und Staphylokokkus aureus intakt Zellen (Cowan I) wurden als Kontroll-

65

le verwendet.

IgG, IgM und IgA wurden in den zellfreien Kulturüberständen mit Hilfe eines Peroxidase-ELISA-Systems gemessen.

Vorteilhaft wirkt sich die Phosphatase und 70KD Protein auf die B-Zellen als stimulierender Faktor aus. Gute Ergebnisse sind auch in geringer Konzentration (2 µg/ml) mit oder ohne IL-2 zu erzielen. Dieser Aktivierungs-Effekt war höher als der Effekt von intakten bakteriellen Zellen. Dies zeigt, daß die Phosphatase und 70KD Protein die Stimulatoren für B-Zellen sind.

II. Abtrennung von Immunoglobulin und Substrat von Phosphatase aus Lösungen durch Anwendung von immobilisierte Phosphatase und 70KD Proteine zu aktiviertem solidem Matrix

Aktiviertes solides Matrix (z. B. CN Br-aktivierten Sepharose 4B) wird mit Phosphatase und/oder 70KD Protein gekoppelt. Lyophilisierte Phosphatase oder 70KD Protein wird in Bindungs-Puffer (0,5M Na Phosphat pH 7,4) gelöst und mit dem entsprechenden Matrix (5–10 mg Protein/ml Matrix) bei 4°C für 3–12 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen 10 Volumen von 100 mM Äthanolamine pH 7,4 wird zugesetzt und bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen in PBS wird die entsprechende Probe dazu gegeben und bei Raumtemperatur für 4–12 Stunden inkubiert. Eine Säule wird mit Matrix abgefüllt und gewaschen. Das gebundene Material wird mit 100 mM Glycin pH 5 eluiert und dann neutralisiert. Das Matrix wird mit neutralem Tris maleate, 0,1% NaN₃ Puffer gewaschen und kann bei 4°C gelagert werden.

Die Ausbeute:

— 0,1 mg immobilisierte Phosphatase oder 70KD Protein kann 500 µg Polyklonal IgG, IgM, IgA oder F(ab)₂ Teilen binden.

Der Vorteil besteht darin, daß die immobilisierte Phosphatase oder 70KD Protein von ihren biologischen Eigenschaften so angelegt ist, daß sie sowohl Polyklonal IgG, IgM, IgA und Kappa myeloma Immunoglobulin bindet. Diese Affinität besteht auch für Human und Rat Igs insbesondere Kappa oder Polyklonal Igs. Phosphatase enzymatische Aktivität kann man auch für eine Substrat-Analog-Abtrennung benutzen.

Patentanspruch

Verfahren zur Anwendung von gereinigten aktiven Immunoglobulinen-Bindung-Staphylokokkal:

- Neutral Phosphatase.
- 70KD Protein.

Die Herstellung von Proteinen ist durch:

- Immunoaffinität-Reinigungs-Verfahren durch Anwendung von Anti-Phosphatase und Anti-70KD-Protein gekoppelte Antikörper zur aktiviertem Matrix,
- Ionenaustauschkromatography-Verfahren durch Anwendung von Kationenaustauscher-Matrix,
- Affinitätskromatography-Verfahren durch Anwendung von Immunoglobulin gekoppelt zur soliden Phase Matrix,

dadurch gekennzeichnet, daß man

1. eine Stimulierung von terminalen Blutlymphozyten und Immunoglobulinsynthese er-

füllt.

2. Abtrennung von Immunoglobulinen, F(ab)₂ Teilen und die Substrat-Analoge von Phosphatase aus Lösungen durch Anwendung von immobilisierten Phosphatase und 70KD Protein zur aktiviertem soliden Phase Matrix.

— Leerseite —